

水痘-带状疱疹病毒探针法 qPCR 试剂盒

Varicella-Zoster Virus Probe qPCR Kit

目录号: ml104451

使 用 说 明 书

产品及特点

水痘-带状疱疹病毒 (Varicella-Zoster Virus, VZV) 属人类疱疹病毒 α 亚科, 又称人类疱疹病毒 3 型 (Human Herpes Virus Typs 3, HHV-3) 是水痘和带状疱疹的病原体, 其基因组为线性双链 DNA 分子, 长约 124884bp。是一种儿童初次感染引起水痘, 恢复后病毒潜伏在体内, 少数病人在成人后病毒再发而引起带状疱疹的病毒。水痘是具有高度传染性的儿童常见疾病, 多发于 2~6 岁, 传染源主要是患者, 患者急性期水痘内容物及呼吸道分泌物内均含有病毒。曾患过水痘的病人引起带状疱疹后, 初期局部皮肤有异常感, 搔痒、疼痛, 进而出现红疹、疱疹, 串连成带状, 病程约 3 周左右, 少数可达数月之久, 还有可能出现脑脊髓炎和眼结膜炎等并发症。该病毒对人体健康有长期潜在危害, 因此水痘-带状疱疹病毒的快速准确鉴定对该病的预防和检疫有着重要作用, 为此本公司开发了简单快捷的水痘-带状疱疹病毒探针法荧光定量 PCR 检测试剂盒, **它具有下列特点:**

1. 即开即用，用户只需要提供样品 DNA 模板。
2. 引物和探针经过优化，分析灵敏性高，可以达到 100 拷贝/反应。
3. 提供阳性对照，便于区分假阴性样品。
4. 特异性高，引物是根据水痘-带状疱疹病毒 DNA 高度保守区设计，不会跟其他细菌的 DNA 发生交叉反应。
5. 涵盖性广，尤其是能检查危害人类健康的几种水痘-带状疱疹病毒。
6. 既可用于定性检测，又可用于定量检测。用于定量检测时线性范围至少为 5 个数量级。
7. 本产品足够 50 次 20 μ L 体系的探针法荧光定量 PCR 反应。
8. 本产品只能用于科研。

规格及成分

成分	规格	包装
2 \times Probe qPCR MasterMix	500 μ L	0.5mL 本色管
荧光 PCR 专用模板稀释液	1mL	1.5mL 绿盖管
超纯水	1mL	1.5mL 蓝盖管
水痘-带状疱疹病毒 qPCR 引物-探针干粉	50 次	1.5mL 棕色管
水痘-带状疱疹病毒 qPCR 阳性对照(1E7 拷贝/ μ L)	50 μ L	0.5mL 黄盖管
使用手册	1 份	无
本产品采用五孔盒包装		
<p>注意：引物-探针干粉在使用前需要短暂离心，然后在离心管中加入 165μL 的超纯水充分混匀后再使用，未用完的需要-20$^{\circ}$C保存。</p>		

使用方法

一、稀释标准曲线样品 (以 1E1-1E6 拷贝/ μ L 这 6 个 10 倍稀释度为例)。由于标准品浓度非常高, 因此下列稀释操作一定要在独立的区域进行, 千万不能污染样品或本试剂盒的其他成分)。为增加产品稳定性和避免扩散传染性病原, 本产品不提供活体样品做阳性对照, 只提供无传染性的 DNA 片段作为阳性对照。

1. 标记 6 个离心管, 分别为 6, 5, 4, 3, 2, 1。
2. 用带芯枪头分别加入 45 μ L 荧光 PCR 专用模板稀释液, 用带芯枪头, (下同)。
3. 在 6 号管中加入 5 μ L 1E7 拷贝/ μ L 的阳性对照(试剂盒提供), 充分震荡 1 分钟, 得 1E6 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
4. 换枪头, 在 5 号管中加入 5 μ L 1E6 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步稀释所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E5 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
5. 换枪头, 在 4 号管中加入 5 μ L 1E5 拷贝/ μ L 的阳性对照(上步所得), 充分震荡 1 分钟, 得 1E4 拷贝/ μ L 的标准曲线样品。放冰上待用。
6. 重复上面的操作直到得到 6 个稀释度的标准曲线样品。放冰上待用。

二、样品 DNA 的制备

7. 如果有 N 个样品, 设置 N+2 个提取, 多出的一个是 PC (样品制备阳性对照), 一个是 NC (样品制备阴性对照)。可以用 10 μ L 上步所得 4 号稀释液再加上一定量的水使总体积跟每次制备要求的体积一样, 以此作为 PC。
8. 用自选方法纯化样品的 DNA, 本试剂盒跟市场上大多数样品 DNA 提取试剂盒兼容。也可以选购本公司的免提取核酸释放剂。

三、Probe qPCR 反应 (20 μ L 体系, 在样品制备室进行)

9. 如果做定量分析并且只做 1 次重复, 则标记 N+9 个 PCR 管, 其中 N+2 个用于上步得到的 N+2

个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），6 个用于标准曲线。如果做定性分析并且只做 1 次重复，则标记 N+4 个 PCR 管，其中 N+2 个用于上步得到的 N+2 个样品，1 个用于 PCR 阴性对照（用水做模板），1 个用于 PCR 阳性对照（直接用第 6 步第 4 号管的阳性对照稀释液做模板）。下面只以定量分析为例描述操作步骤。

10. 在标记管中按下表加入各成分（本表只列出一次重复。样品管和阴性对照设

置完毕后才设置阳性对照，并且阳性对照样品要等所有管子盖上盖子储存好后加）：

成分	样品管 N+3 个	RT-PCR 阴性对照	标曲样品管 (1-6)
2×Probe qPCR MasterMix	各 10μL	各 10μL	各 10μL
水痘-带状疱疹病毒 qPCR 引物-探针混合液	各 3μL	3μL	各 3μL
待测样本 DNA 模板	7μL	不加	不加
超纯水	不加	7μL	不加
第 6 步所得标准曲线样品稀释液 (1-6 号)	不加	不加	各 7μL

11. 盖上盖子后上机，按下面参数进行 PCR：

过程	温度	时间
预变性	95℃	5min
PCR 反应 (37 个循环)	95℃	15sec
	60℃	1min (采集 FAM 通道，淬灭基团为 TAMRA)

四、数据处理

12. 如果样本制备阳性对照或 PCR 阳性对照(包括标曲样本)结果为阴性，则整个实验无效，不需要分析数据，需要重新样本制备，重新进行 PCR 扩增或跟厂家联系。如果样本制备阴性对照或 PCR 阴性对照结果为阳性，说明环境污染，则整个实验无效，不需要分析数据，需要跟厂家联系。

13. 如果阴性对照和阳性对照均正常，则实验有效，可以进入后续分析。

	<p>14. 如果把本试剂盒用于定量检测，则以阳性对照浓度的 log 值为横轴，以 Ct 值为纵轴，绘制标准曲线。再以待测样品的 Ct 值从标准曲线上推算出样品 DNA 浓度的 log 值，再推算出其浓度。</p> <p>15. 如果把本试剂盒用于定性检测，只判断阳性或阴性，则阴性对照 Ct 必须等于或者大于 35，或者没有 Ct 值。阳性对照必须有荧光对数增长，有典型扩增曲线，Ct 值应该小于 35。对待测样品，如果其 Ct 小于 35 则为阳性。如果在大于或等于 35 则为阴性。</p>
<p>自备试剂</p>	<p>超纯水，样品 DNA。</p>
<p>运输及保存</p>	<p>低温运输，-20℃保存，有效期 2 年。</p>